



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



REC'D 25 MAY 2004

WIPO PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200301526, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 1 de Julio de 2003.

Madrid, 27 de Abril de 2004



El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.



CARMEN LENCE REIJA

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200301526

03 JUL -1 11:25

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN CÓDIGO
MADRID 28

(1) MODALIDAD <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCIÓN <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD							
(2) TIPO DE SOLICITUD <input type="checkbox"/> ADICIÓN A LA PATENTE <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> PCT: ENTRADA FASE NACIONAL		(3) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD PATENTE NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD 01/07/2003					
(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOLOGIES, S.L.		NOMBRE		NACIONALIDAD ESPAÑOLA	CÓDIGO PAÍS ES	DNI/CIF B62520788	CNAE PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE DOMICILIO Baldiri Reixac, 10-12 LOCALIDAD PROVINCIA BARCELONA PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA NACIONALIDAD ESPAÑA		TELEFONO		
		FAX		
		CORREO ELECTRÓNICO		
		CÓDIGO POSTAL 08028		
		CÓDIGO PAÍS ES		
		CÓDIGO NACION ES		
(7) INVENTOR (ES): SONIA GONZALEZ		NOMBRE MYRIAM FABRE	NACIONALIDAD ESPAÑOLA	CÓDIGO PAÍS ES
(8) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR		(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: <input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN		

(9) TÍTULO DE LA INVENCIÓN MÉTODO PARA EL ALMACENAMIENTO Y/O TRANSPORTE DE CULTIVOS CELULARES IN VITRO.	
--	--

MOJ. 30H - 1- EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:		<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
---	--	--

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR		FECHA
------------------------------------	--	-------

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA
--	--	-------------	--------	-------

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES		<input type="checkbox"/>
--	--	--------------------------

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES) CARPINTERO LOPEZ, FRANCISCO, 403/0, ALCALA, 35, MADRID, MADRID, 28014, ESPAÑA	
--	--

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: <input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION N.º DE PÁGINAS: 15 <input checked="" type="checkbox"/> N.º DE REIVINDICACIONES: 3 <input type="checkbox"/> DIBUJOS N.º DE PÁGINAS: <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS N.º DE PÁGINAS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD		<input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input type="checkbox"/> CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN <input checked="" type="checkbox"/> OTROS: DISKETE	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE FRANCISCO CARPINTERO LOPEZ P.P.
			(VER COMUNICACIÓN)
			FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN: Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986	
---	--



NÚMERO DE SOLICITUD

P200301526

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

MÉTODO PARA EL ALMACENAMIENTO Y/O TRANSPORTE DE CULTIVOS CELULARES IN VITRO.

El método para el almacenamiento y/o el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro comprende las siguientes etapas:
a) recubrimiento con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5% de un cultivo celular organizado inmovilizado sobre un soporte asimétrico, comprendiendo dicho cultivo celular células en el estado funcional adecuado,
b) solidificación a una temperatura de 15 a 25°C de la gelatina adicionada al soporte, y
c) almacenamiento y/o transporte del cultivo celular a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de hasta 96 horas.
La presente invención también proporciona un kit para el almacenamiento y/o el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro según el método de la invención que comprende:
i. un soporte asimétrico, y
ii. una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5%.

GRÁFICO

12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

(31) NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD		(32) FECHA	(33) PAÍS	(22) FECHA DE PRESENTACIÓN 01/07/2003
(71) SOLICITANTE (S) ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOLOGIES, S.L.			(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA		
DOMICILIO Baldíri Reixac, 10-12 BARCELONA, 08028, ESPAÑA		NACIONALIDAD ESPAÑA			
(72) INVENTOR (ES) MYRIAM FABRE SONIA GONZALEZ					
(51) Int. Cl.		GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)			
(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN MÉTODO PARA EL ALMACENAMIENTO Y/O TRANSPORTE DE CULTIVOS CELULARES IN VITRO.					
(57) RESUMEN MÉTODO PARA EL ALMACENAMIENTO Y/O TRANSPORTE DE CULTIVOS CELULARES IN VITRO. El método para el almacenamiento y/o el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro comprende las siguientes etapas: a) recubrimiento con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 a 5% de un cultivo celular organizado inmovilizado sobre un soporte asimétrico, comprendiendo dicho cultivo celular células en el estado funcional adecuado, b) solidificación a una temperatura de 15 a 25°C de la gelatina adicionada al soporte, y c) almacenamiento y/o transporte del cultivo celular a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de hasta 96 horas. La presente invención también proporciona un kit para el almacenamiento y/o el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro según el método de la invención que comprende: i) un soporte asimétrico, y ii) una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5%.					

**MÉTODO PARA EL ALMACENAMIENTO Y/O TRANSPORTE DE
CULTIVOS CELULARES IN VITRO.**

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se relaciona con la obtención de un método para el almacenamiento y de transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro, así como con la obtención de un kit para el almacenamiento y transporte de dichos cultivos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los cultivos celulares, homogéneos o no (cocultivos), pueden constituir modelos útiles de algunos procesos genéticos, bioquímicos, metabólicos o fisiológicos que tienen lugar en el organismo vivo. La facilidad de su manipulación permite el análisis de gran número de condiciones antes de realizar los experimentos definitivos en animales o los ensayos clínicos en seres humanos. Los modelos "in vitro" constituyen una herramienta para la validación de nuevas dianas terapéuticas, para la selección de cabezas de serie en sistemas de alto rendimiento, para la definición del mecanismo de acción de nuevas moléculas y, en general, para la investigación biomédica, biotecnológica o cosmética.

En general, todos los modelos basados en cultivos celulares tienen una vida útil limitada. Así, las células en cultivo pasan por diferentes fases de diferenciación, y requieren de manipulación continua para mantener las propiedades que las hacen un modelo adecuado. Por ejemplo, el modelo de barrera gastrointestinal basado en el cultivo confluente de células Caco-2

requiere 21 días para alcanzar el estado de diferenciación que permite reproducir muchas de las propiedades de la mucosa intestinal (Le Ferrec et al., ATLA 29:649-668, 1999), y su utilidad se prolonga sólo durante una ventana de unos 3 a 5 días. Las células BC2, utilizadas como modelo de célula hepática, requieren entre tres y cuatro semanas de diferenciación antes de adquirir las propiedades que las hacen un buen modelo, y las condiciones de cultivo posteriores son clave para que respondan a los tratamientos experimentales de forma parecida al hepatocito (MJ Gómez-Lechón, et al., Eur.J. Biochem.268:1448, 2001). Las células de cordón umbilical Huvec, crecidas hasta confluencia, pueden ser inducidas a formar estructuras comparables a los vasos sanguíneos en condiciones experimentales adecuadas, por lo que constituyen un buen modelo de angiogénesis (Vailhe et al., Lab. Invest. 81:439-452, 2001). Sin embargo, el número de divisiones celulares previo al experimento y el estímulo utilizado son críticos para obtener una respuesta adecuada.

Estas limitaciones en la manipulación y generación de los diferentes modelos celulares "in vitro" los hacen de difícil implementación para los usuarios ocasionales, y en general limitan la comercialización de los modelos en su formato final. El problema se agudiza en modelos complejos, en los que las células deben imitar a las barreras naturales del organismo (Rubas et al., J. Pharma. Sci., 85:165-169, 1996; Walter et al., J. Pharma. Sci., 85:1070-1076; Irvine et al., J. Pharma. Sci., 88:28-33, 1999; Gaillard et al., Eur. J. of Pharma. Sci., 12:215-222, 2001); o los cultivos deben realizarse sobre soportes

asimétricos, separando dos compartimientos o con una fuerte dependencia en la polarización de los componentes del sistema. En estos casos, a la complejidad del modelo y a sus limitaciones temporales se añaden problemas de tipo mecánico, que hacen que los golpes o las sacudidas puedan invalidar el sistema. Los investigadores pueden acceder a los diferentes componentes del modelo (soporte, medio y aditivos de cultivo y líneas celulares), y posteriormente deben combinarlos en el laboratorio utilizando procesos más o menos laboriosos. En el mejor de los casos el investigador final puede recibir las células ya listas para su uso, pero con limitaciones que prácticamente obligan a realizar los experimentos dentro de los dos días posteriores a la recepción, e imponen serias restricciones en la distribución del modelo por parte de la compañía que lo comercializa, como por ejemplo In Vitro Technologies. El documento EP 702 081 describe un método para el almacenamiento y transporte de tejidos tridimensionales que consiste en situar dicho tejido tridimensional fijado sobre dos tipos de esponjas en una solución de gelatina, de tal forma que por enfriamiento ésta se gelifica, facilitando así su transporte y almacenamiento.

Existe por tanto en el estado de la técnica la necesidad de disponer de un método para poder suministrar modelos basados en cultivos celulares bidimensionales organizados a punto para ser utilizados y con sus propiedades funcionales intactas de forma que, por un lado, el investigador disponga de margen de maniobra para su utilización y, por otro, la compañía

suministradora pueda plantear tiempos de entrega dentro de los márgenes logísticos razonables de la distribución internacional.

El objeto de la presente solicitud consiste en proporcionar un método para el almacenamiento y el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro que resuelva las necesidades del estado de la técnica mencionadas anteriormente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona en su aspecto principal un método para el almacenamiento y/o el transporte de cultivos celulares organizados in vitro que comprende las siguientes etapas:

- a) recubrimiento con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 a 5% de un cultivo celular organizado inmovilizado sobre un soporte asimétrico, comprendiendo dicho cultivo celular células en el estado funcional adecuado,
- b) solidificación a una temperatura de 15 a 25°C de la gelatina adicionada al soporte, y
- c) almacenamiento y/o transporte del cultivo celular a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de hasta 96 horas.

La presente solicitud también proporciona en un segundo aspecto de la invención un kit para el almacenamiento y el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro según el método de la invención que comprende:

- i) un soporte asimétrico, y
- ii) una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5%.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona en su aspecto principal un método para el almacenamiento y/o el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro que comprende las siguientes etapas:

- a) recubrimiento con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 a 5% en peso de un cultivo celular organizado inmovilizado sobre un soporte asimétrico, comprendiendo dicho cultivo celular células en el estado funcional adecuado,
- 5 b) solidificación a una temperatura de 15 a 25°C de la gelatina adicionada al soporte, y
- 10 c) almacenamiento y/o transporte del cultivo celular a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de hasta 96 horas.

15 En una realización particular, el método de la invención comprende las siguientes etapas adicionales:

- d) licuación de la gelatina,
- e) eliminación de la gelatina y sustitución de la misma por un medio de cultivo, y,
- 20 f) incubación del cultivo.

25 El método de la invención hace posible que durante el almacenamiento y/o transporte del cultivo o modelo celular se mantengan las propiedades fisiológicas de las células y, además, que se protejan las propiedades mecánicas esenciales para el modelo celular.

30 En el contexto de la presente invención se entiende por soporte asimétrico aquellos recipientes que contienen dos compartimentos físicamente separados por una membrana semipermeable encima de la cual se sitúan las células del cultivo. Como soporte asimétrico preferido la presente invención emplea el soporte tipo transwell.

Los cultivos celulares bidimensionales de la invención son cultivos organizados como por ejemplo: células Huvec crecidas a confluencia sobre un soporte de colágeno; cultivo confluente de células Caco-2 diferenciadas; o cualquier otro tipo de células capaz de crecer en monocapas tales como fibroblastos, células tumorales, hepáticas, endoteliales, etc. Así, ejemplos de líneas epiteliales intestinales derivadas de tumores son Caco-2, TC7, HT29 M6; un ejemplo de línea de epitelio de riñón es MDCK; un ejemplo de keratínocitos humanos primarios de piel es HEK; finalmente ejemplos de líneas o cultivos primarios endoteliales son HUVEC, HMEC-1, BBEC, HAEC y BAEC. Preferentemente, el cultivo celular bidimensional organizado de la invención está diferenciado, polarizado y es funcionalmente activo.

Según la presente invención, la solución de gelatina se prepara disolviendo gelatina en el mismo medio de cultivo, que actúa como disolvente. Gracias al empleo del medio de cultivo como disolvente se consigue que el cultivo almacenado y/o transportado según el método de la presente invención garantiza al usuario la preservación de las propiedades funcionales del cultivo y una utilización inmediata. Preferiblemente la solución de gelatina empleada es del 2.5% en peso.

En el método de la invención se puede emplear cualquier gelatina comercial, como por ejemplo gelatina tipo A de piel de cerdo. Similarmente, también se puede emplear cualquier medio de cultivo comercial, como un medio DMEM (1 g/L glucosa). Es “aconsejable” preparar la solución de gelatina con un máximo de 7 días antes de aplicarla al cultivo, ya que de lo contrario ésta pierde parte de sus propiedades de “conservación”, las cuales son necesarias para el buen funcionamiento de la presente invención.

La solución de gelatina en el medio de cultivo puede ser suplementada con suero bovino fetal (FBS 10%) y Penicilina/Streptomicina/L-Glutamina (medio de cultivo completo).

El cultivo celular puede prepararse del siguiente modo: realizar primeramente, antes de sembrar las células, un *coating* que implica: 1) colocar los insertos o *transwells* encima de los pocillos de tamaño correspondiente; 2) aplicar sobre la cara superior de los filtros (membranas semipermeables) de cada inserto una solución de colágeno (u otro componente de matriz extracelular, dependiente del tipo celular) en medio de cultivo DMEM (1g/L glucosa) sin suero; y 3) dejar preferiblemente a 37°C en la estufa para cultivos celulares (90% humedad, 5% CO₂). Antes de la utilización del inserto, se aspira el exceso de solución de *coating* de la cara apical, se deja aproximadamente de 15 a 30 minutos en la estufa para cultivos, y se siembran las células correspondientes a la densidad determinada para cada tipo celular y para cada tipo de ensayo. Se mantiene el cultivo durante el tiempo necesario al alcance del estado funcional del sistema, con cambios de medio preferiblemente cada 48–72 horas si necesario. Las características de los insertos o *transwells* utilizados (tamaño, diámetro de poros, material) vienen determinadas de manera específica por el tipo celular y el ensayo al cual se puede aplicar la presente invención. En función del tipo de célula empleada en el cultivo y del tipo de ensayo, tras un número de días transcurridos, se realizan controles para determinar el estado funcional del sistema celular. Por ejemplo, en el caso de los sistemas celulares que se utilizan como modelos de barreras, se pueden emplear medida de TEER (Resistencia Eléctrica TransEpitelial) y permeabilidad paracelular.

Según la presente invención, el cultivo celular se recubre con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración de 1 a 5%. De forma general, se aplicará la gelatina en el preciso momento en que se haya comprobado que el sistema celular acaba de alcanzar el estado funcional adecuado, de manera que se inmoviliza el sistema celular ya funcional, pero se deja al usuario un margen de tiempo para hacer sus ensayos al recibir el sistema. Al tiempo de cultivo transcurrido se denomina “tiempo de vida”. De

5 aquí la aplicación de la presente invención a sistemas celulares “*ready-to-use*”. Los tiempos de vida de los cultivos celulares, es decir el tiempo de vida del cultivo en que se aplica la gelatina, dependen no sólo de los tipos celulares del cultivo (fibroblastos, líneas tumorales, etc.) sino también de su aplicación funcional (ensayo de paso de barrera, ensayo de adhesión, ensayo de migración, ensayo de invasión). Su determinación es una cuestión de práctica experimental. Así, en el caso específico de los fibroblastos y células HUVEC sembradas en soportes tipo *transwell* y en condiciones bajo las cuales estas células estén funcionalmente activas para un ensayo de migración, el tiempo de vida será entre 30 minutos y 1 hora después de sembrar las células. En el caso de un ensayo de invasión, el tiempo será entre 1 y 24 horas. En cambio, 10 en el caso de las células Caco-2 sembradas en *transwells*, el tiempo de vida será 13 días después de sembrar las células, tiempo a partir del cual ya son funcionales como barrera y se aplica la gelatina, dejando al usuario hasta el 15 día 25 de cultivo para realizar el ensayo de paso de barrera.

En el contexto de la presente invención se entiende por *estado funcional adecuado*, el estado que presentan las células viables del cultivo cuando son capaces de realizar la función que tienen asignada en el ensayo.

20 Para efectuar la aplicación de la gelatina sobre el cultivo en primer lugar es necesario licuar completamente la solución de gelatina, y equilibrarla a la temperatura del cultivo, en general 37°C. A continuación, se retira el medio de cultivo de los 2 compartimentos de cada inserto y se lava el cultivo con medio de cultivo completo en los 2 compartimentos de cada inserto. 25 Posteriormente se aplica gelatina 2,5% líquida en el compartimiento apical y en el compartimiento basal, y se deja solidificar entre 2 y 3 horas en la campana de flujo y a temperatura ambiente (20-25°C). Una vez ha solidificado la gelatina, se sellan las placas con parafilm y se mantienen a temperatura ambiente hasta su utilización (máximo 4 días después).

En el momento en que se quiera utilizar el cultivo inmovilizado, se incuba la placa con gelatina sólida dentro de un incubador de células hasta la completa licuación de la gelatina, preferiblemente a 37°C, 90% humedad y 5% CO₂ durante 3 a 4 horas hasta la completa licuación de la gelatina. A continuación se elimina de ambos compartimentos mediante aspiración y se lava el cultivo con medio de cultivo completo equilibrado a 37°C. Posteriormente se aplica el medio de cultivo específico para las células en cuestión y se incuban estas últimas preferiblemente a 37°C en 90% humedad / 5% CO₂ hasta su uso.

10

La presente solicitud proporciona en un segundo aspecto de la invención un kit para el almacenamiento y el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados *in vitro* según el método de la invención que comprende:

- i) un soporte asimétrico, y
- ii) una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5%.

20

En una realización particular, el kit de la presente invención emplea como soporte asimétrico un soporte tipo *transwell*.

Los ejemplos que se describen a continuación sirven para ilustrar la invención.

25

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Método para el almacenamiento y transporte del modelo Caco-2 de barrera intestinal *in vitro*.

30

1- Preparación de la gelatina

Se utiliza gelatina tipo A de piel de cerdo, disuelta en medio de cultivo DMEM (1g/L glucosa) a 50°C y directamente a la concentración de uso (máxima concentración que se puede disolver: 10%). En el presente caso, se pesan 2,5g de gelatina en polvo y se disuelve con 100 ml de medio de cultivo DMEM (1g/L glucosa). Se esteriliza en seguida (en "caliente") mediante filtración por filtros de 0,22 μ m de poro. A continuación se suplementa con suero bovino fetal (FBS 10%) y Penicilina/Streptomicina/L-Glutamina (medio de cultivo completo). Finalmente se guarda a 4°C hasta su utilización.

10 2- Preparación del cultivo Caco-2 polarizado.

15 *Coating:* 12 horas antes de sembrar las células, se colocan los insertos (*transwells* de 6,5mm de diámetro) encima de los pocillos de tamaño correspondiente, y se aplica sobre la cara superior de los filtros de policarbonato (membranas semipermeables de 0,4 μ m de diámetro de poro) de cada inserto una solución de colágeno tipo I de cola de rata (20 μ g/ml) en medio de cultivo DMEM (1g/L glucosa) sin suero, y se deja a 37°C en la estufa para cultivos celulares (90% humedad, 5% CO₂). Antes de su utilización, se aspira el exceso de solución de *coating* de la cara apical, se deja de 15 a 30 minutos en la estufa para cultivos, y se siembran las células Caco-2 a una densidad de 5×10^5 células/cm². Se mantiene el cultivo durante 13 días, con cambios de medio cada 48–72 horas, poniendo 300 μ l de medio de cultivo completo en el compartimento apical y 900 μ l en el basal. Al día 13, se realizan los controles de estado de barrera (polarización) de la monocapa Caco-2 mediante medida de TEER (Resistencia Eléctrica TransEpitelial) y permeabilidad paracelular. Estos controles permiten determinar el estado funcional del sistema celular como barrera antes de recubrir con gelatina.

20 25 3- Aplicación de la gelatina

30 Se pone en un baño de cultivo a 37°C hasta su completa licuación y se equilibra a la temperatura del cultivo (37°C). A continuación, se retira el medio de cultivo de los 2 compartimentos de cada inserto y se lava el cultivo

con medio de cultivo completo en los 2 compartimentos de cada inserto. Posteriormente se aplica 300 μ l de gelatina 2,5% líquida en el compartimiento apical y 900 μ l en el compartimiento basal, y se deja solidificar entre 2 y 3 horas en la campana de flujo y a temperatura ambiente (20-25°C). Una vez ha solidificado la gelatina, se sellan las placas con parafilm y se mantienen a temperatura ambiente hasta su utilización (máximo 4 días después).

4- Eliminación de la gelatina

En el momento en que se quiera utilizar el cultivo inmovilizado, se 10 incuba la placa con gelatina sólida dentro de un incubador de células a 37°C, 90% humedad y 5% CO₂ durante 3 a 4 horas hasta la completa licuación de la gelatina. A continuación se elimina de ambos compartimentos mediante aspiración y se lava el cultivo con medio de cultivo completo equilibrado a 37°C. Posteriormente se aplica el medio de cultivo específico para células 15 Caco-2 y se incuban las células a 37°C en 90% humedad / 5% CO₂ hasta su uso (mínimo 24 horas; máximo 9 días después), cambiando el medio cada 48-72 horas.

20 **Tabla I: Estabilidad del estado funcional de barrera del sistema celular Caco-2 almacenado en gelatina 2,5% a temperatura ambiente, evaluado mediante medida de TEER (valores en ohm x cm²).**

		TIEMPO INMOVILIZACIÓN EN GELATINA				
		1 DIA	3 DIAS	4 DIAS	5 DIAS	7 DIAS
ANTES		3637,81 \pm 93,34	3027,97 \pm 154,55	4949,01 \pm 140,90	4855,51 \pm 5,5	4853,51 \pm 5,5
TIEMPO	3 DIAS	3451,89 \pm 541,30	3117,73 \pm 13,10	3528,51 \pm 198,45	1743,17 \pm 63,29	882,97 \pm 56
DESPUES	5 DIAS	3434,53 \pm 5,81	3143,03 \pm 178,6	ND	ND	ND
GELATINA	9 DIAS	4110,15 \pm 503,74	3318,15 \pm 267,4	ND	ND	ND

(ND: No Determinado)

25

Tal y como se presenta en la Tabla I, solo se observa una disminución significativa en los valores de TEER obtenidos después de 5 y 7 días de

5 inmovilización en gelatina comparando con los valores controles obtenidos antes de aplicarla. Este resultado indica que el método de almacenamiento en gelatina descrito en esta invención permite: 1) inmovilizar el sistema Caco-2 hasta 4 días a temperatura ambiente sin afectar su estado funcional de barrera; y 2) una vez quitada la gelatina, mantener hasta 9 días después su estado funcional para realizar ensayos de paso de barrera.

10 **Ejemplo 2: Características de los cultivos y determinación de los tiempos de vida del cultivo antes de aplicar la gelatina.**

15 En la Tabla II se indican algunos de los tipos celulares cultivables en soportes tipo *transwells* que forman monocapas y que son susceptibles de ser almacenables y transportables en gelatina en su estado de barrera y, por tanto, cultivos a los cuales es aplicable el presente método de transporte.

20

- Caco-2, TC7, HT29 M6: líneas epiteliales intestinales derivadas de tumores,
- MDCK: línea de epitelio de riñón,
- HEK: keratinocitos humanos primarios de piel,
- HUVEC, HMEC-1, BBEC, HAEC, BAEC: líneas o cultivos primarios de células endoteliales.

25 **Tabla II: Densidades celulares recomendadas para la siembra en insertos y tiempos de cultivo para la obtención de sistemas de barreras in vitro.**

Tipo Celular	Densidad células/ cm ²	Tiempo de cultivo	Tipo de inserto recomendado	Tiempo de vida en aplicar gelatina
Caco-2	5 X 10 ⁵	21-25 días	6.5mm (poro 0,4 μ m)	13-14 días
TC7	6 X 10 ⁴	21-25 días	6.5mm (poro 0,4 μ m)	13-14 días
HT29 M6	5 X 10 ⁵	21-25 días	6.5mm (poro 0,4 μ m)	13-14 días
MDCK	8 X 10 ⁴	6 – 8 días	12mm (poro)	ND

			0,4 \square m)	
HEK	5×10^5	7-8 días	12mm (poro 0,4 \square m)	ND
HUVEC	$6 - 7 \times 10^4$	6-7 días	12mm (poro 0,4 \square m)	ND
HMEC-1	$6 - 7 \times 10^4$	6-7 días	12mm (poro 0,4 \square m)	ND
BBEC	$2,5 \times 10^4$	11-13 días (con astrocitos)	24mm (poro 0,4 \square m)	ND

(ND: No Determinado)

5 Los tiempos de cultivo indicados en la Tabla II se refieren al intervalo de tiempo óptimo de obtención de una monocapa polarizada, más allá del cual pierde sus propiedades funcionales óptimas como barrera celular.

10 La determinación de los tiempos de vida (momento del cultivo en que se aplica la gelatina) de estos sistemas celulares, que permitan a la vez preservar su estado funcional de barrera y dejar tiempo al usuario para realizar el ensayo, se ha efectuado de modo experimental mediante medida de TEER y permeabilidad paracelular.

15 La gelatina se aplica al cultivo en el momento en que éste alcanza el estado funcional adecuado. En el caso del ensayo de paso de barrera de células Caco-2, la gelatina se aplica preferiblemente a día 13 (tiempo mínimo aproximado en el cual las células empiezan a formar una monocapa polarizada funcional o barrera). Se pueden mantener en gelatina hasta aproximadamente el día 17 a temperatura ambiente y utilizarse hasta aproximadamente día 25, sin perder sus propiedades funcionales de barrera.

25 Los tiempos de vida bien de otros tipos celulares (fibroblastos, líneas tumorales), o bien de estos mismos descritos en la Tabla II pero definidos para otras aplicaciones funcionales diferentes del ensayo de paso de barrera

(ensayo de adhesión, ensayo de migración, ensayo de invasión), representan diferentes tiempos de aplicación de la gelatina. Así, en el caso específico de los fibroblastos y células HUVEC sembradas en soportes tipo *transwell* y en condiciones bajo las cuales estas células estén funcionalmente activas para un ensayo de migración, el tiempo de vida será entre 30 minutos y 1 hora después de sembrar las células. En el caso de un ensayo de invasión el tiempo será entre 1 y 24 horas.

REIVINDICACIONES

1. Método para el almacenamiento y el transporte in vitro de cultivos celulares bidimensionales organizados que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) recubrimiento con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 a 5% de un cultivo celular organizado inmovilizado sobre un soporte asimétrico, comprendiendo dicho cultivo celular células en el estado funcional adecuado,
- 10 b) solidificación a una temperatura de 15 a 25°C de la gelatina adicionada al soporte, y
- c) almacenamiento y/o transporte del cultivo celular a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de hasta 96 horas.

15 2. Método según la reivindicación 1 que comprende las etapas adicionales:

- a) licuación de la gelatina,
- b) eliminación de la gelatina y sustitución de la misma por un medio de cultivo, y
- c) incubación del cultivo.

20 25 3. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el cultivo celular bidimensional organizado está diferenciado, polarizado y es funcionalmente activo.

30 4 Método según la reivindicación 3 caracterizado porque el cultivo celular está seleccionado de entre: células Huvec crecidas a confluencia sobre un soporte de colágeno y células Caco-2 diferenciadas, o cualquier otro tipo de células capaz de crecer en monocapas tales como fibroblastos, células tumorales, hepáticas, endoteliales, etc.

4. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la solución de gelatina empleada es del 2.5%

5. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la gelatina se solidifica a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de 30 minutos a 12 horas.

10 6. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el soporte asimétrico es un soporte tipo transwell.

15 7. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la licuación de la gelatina se efectúa entre 35 y 40°C durante un periodo de 1 a 4 horas.

8. Método según la reivindicación 7 caracterizado porque la licuación de la gelatina se efectúa a 37°C.

20 9. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la incubación posterior del cultivo se efectúa entre 35 y 40°C durante un periodo de 1 hora a 8 días.

10. Método según la reivindicación 9 caracterizado porque la incubación posterior del cultivo se efectúa a 37°C.

25 11. Kit para el almacenamiento y/o el transporte in viro de cultivos celulares bidimensionales organizados según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que comprende:

30 i) un soporte asimétrico, y
ii) una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5%.

12. Kit según la reivindicación 11 caracterizado porque el soporte asimétrico es un soporte tipo transwell.